О ВЛИЯНИИ АЦЕТИЛХОЛИНА И АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ НА АКТИВНОСТЬ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ ВАКУОЛИ *AMOEBA PROTEUS*

© *Я. Ю. Багров, Н. Б. Манусова*

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург; электронный адрес: nmanus@rambler.ru

Ацетилхолин (АХ, 1 мкМ) стимулирует активность сократительной вакуоли амебы *Amoeba proteus*. Действие АХ не воспроизводится его аналогами, не гидролизуемыми ацетилхолинэстеразой (АХЭ), — карбохолином и 5-метилфурметидом. Действие АХ не блокируется М-холинолитиками (атропином и митолоном), но подавляется n-холинолитиком тубокурарином (0.01 мкМ). Ингибиторы АХЭ эзерин (0.001 мкМ) и армин (0.01 мкМ) подавляют действие АХ на сократительную вакуоль амебы. АХ не влияет на активацию сократительной вакуоли, вызванную аргинин-вазопрессином (АВП, 1 мкМ), но блокирует активацию сократительной вакуоли, вызванную лигандом опиоидных рецепторов динорфином А (1-13) в концентрации 0.1 мкМ. На основании сопоставления полученных данных с литературными делается вывод о том, что в описанных эффектах АХ фермент АХЭ играет роль синергиста, а не антагониста. Регуляция активности сократительной вакуоли и, следовательно, водно-солевого гомеостаза *A. proteus* осуществляется тремя независимыми механизмами через рецепторы АВП, АХ и опиоидной системы.

Ключевые слова: простейшие, *Amoeba proteus*, сократительная вакуоль, ацетилхолин, ацетилхолинэстераза, «неэнзиматический» эффект ацетилхолинэстеразы, аргинин-вазопрессин, динорфин А (1-13).

Принятые сокращения: АВП — аргинин-вазопрессин, АДГ — антидиуретический гормон, АХ — ацетилхолин, АХЭ — ацетилхолинэстераза.

Целью данной работы является исследование роли холинэргической системы амебы *Amoeba proteus* в регуляции водно-солевого обмена. Единственным компонентом холинергической системы, обнаруженной у простейших, является истинная ацетилхолинэстераза (АХЭ) (Corrado et al., 1999; Falugi et al., 2002). Она была найдена у *Paramecium primaurelia* и амебы *Dictyostelium discoideum*. Намерение исследовать роль холинергической системы в регуляции водно-солевого обмена у амебы связано с результатами нашей работы на изолированных мочевых пузырях лягушки *Rana tempotaria* (Багров, Манусова, 1978). В этом исследовании было показано, что ацетилхолин (АХ), не обладая собственной активностью, угнетал транспорт воды, стимулированный антидиуретическим гормоном АВП (аргинин-вазопрессином). Классический эффект угнетения АХЭ — фермента, расщепляющего АХ, — усиление действия АХ. Однако на мочевых пузырях лягушки все исследованные нами ингибиторы АХЭ (прозерин, физостигмин, Гд-42, армин и йодметилатакридин) подавляли действие АХ. В этой работе был сделан вывод о «неэнзиматической» роли АХЭ в мочевых пузырях лягушки *R. temporaria* в регуляции водно-солевого обмена. Аналогичные «неэнзиматические» свойства АХЭ были описаны на других системах и у других позвоночных (Webb, Greenfield, 1992; Slotkin et al., 2009).

Как показали наши предыдущие исследования, АВП активирует сократительную вакуоль амебы *A. proteus*, являющуюся ее осморегулирующей органеллой (Couillard et al., 1989; Багров и др., 2002; Bagrov et al., 2003). В связи с этим представлялось интересным исследовать влияние холинергических агентов на транспорт воды, стимулированный АДГ, у амебы *A.proteus*, эволюционно более древнего представителя животного царства.

Наши исследования, проведенные ранее на амебе, показали, что эффект АВП специфичен, поскольку ингибируется блокаторами рецепторов типов V_1 и V_2 (Багров, Манусова, 2003). Было также обнаружено, что в передаче сигнала участвуют аденилатциклаза и циклический аденозинмонофосфат (Багров, Манусова, 2007). Таким образом, система проведения сигнала от рецепторов АВП у амебы оказалась по существу идентичной таковой у позвоночных. Кроме того, мы показали, что способностью активировать сократительную вакуоль амебы обладают вещества опиоидной природы, в частности активатор к-рецепторов динорфин А (1-13), а его действие подавляется неселективным блокатором опиоидных рецепторов налоксоном (Багров, Манусова, 2003).

Поскольку был установлен факт взаимодействия холинергической и опиоидной систем у позвоночных (Соколова, Ашмарин, 1992; Wessler, Kirkpatrick, 2008), с одной стороны, а нами была показана взаимосвязь опиоидной и антидиуретических систем у амебы, представлялось интересным проследить взаимосвязь всех этих систем на примере амебы *A. proteus,* эволюционно более древнего представителя животного царства.

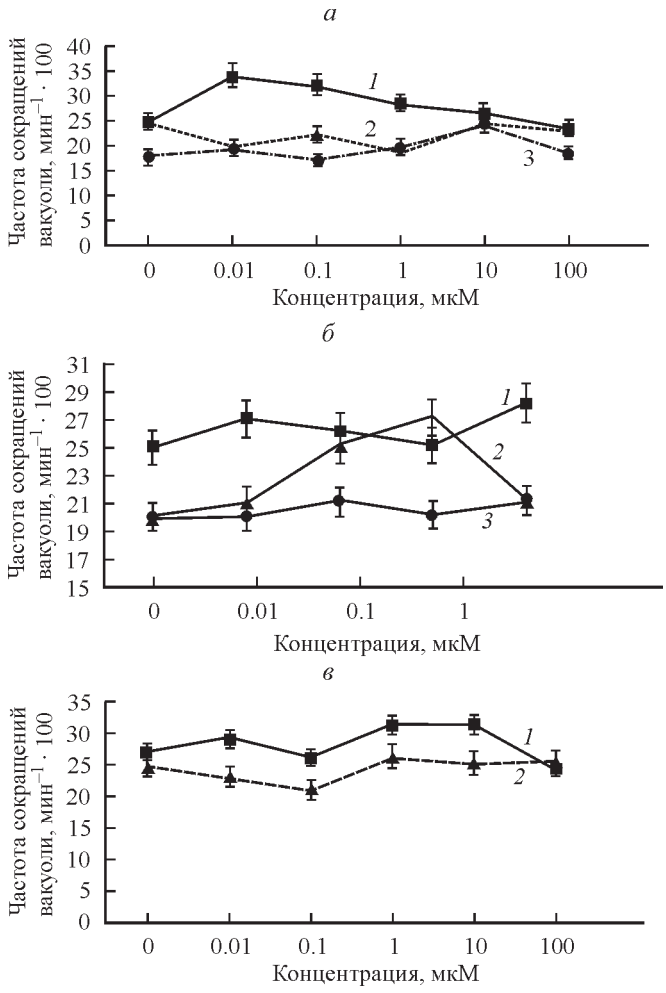

Рис. 1. Влияние антагонистов рецепторов АВП, динорфина А (1-13) и АХ, в также антихолинэстеразных препаратов на частоту сокращений вакуоли *Amoeba proteus*.

а — антагонисты рецепторов АВП типов V_1 (*1*) и V_2 (*2*) и к-рецепторов динорфина А (1-13) (*3*); *б°* — антагонисты холинергической системы: атропин (*1*), митолон (*2*) и тубокурарин (*3*); *в* — ингибиторы АХЭ эзерин (*1*) и армин (*2*); *вертикальные отрезки* — стандартные ошибки среднего.

Таким образом, целью настоящей работы было исследование влияния АХ, его антагонистов, а также блокаторов АХЭ на спонтанную и стимулированную активность сократительной вакуоли амебы *A. proteus*.

Материал и методика

Эксперименты проводили на культуре пресноводных свободноживущих амеб *A. proteus*, как было описано нами ранее (Bagrov et al., 2003). Активность сократительной вакуоли амебы оценивали по частоте ее сокращений за 1 мин и представляли, как мин$^{-1}$ · 100.

При проведении экспериментов амеб делили на 2 группы. В первой группе определяли частоту сокращений вакуоли в среде Прескотта (Prescott, Carrier, 1964) в контрольных условиях, т. е. без добавления препаратов, затем в среду добавляли одно из следующих веществ — АВП, АХ (или его аналог) или динорфин А (1-13) — и через 30 мин вновь определяли частоту сокращений вакуоли.

Амеб второй группы культивировали в течение 60 мин в той же среде Прескотта, содержащей одно из следующих агентов: блокатор рецепторов АХ (атропин, тубокурарин или митолон), антагонист рецепторов АВП типов V_1 и V_2, налаксон (блокатор к-рецепторов опиоидной системы) или ингибитор АХЭ (армин или эзерин). Концентрацию вещества подбирали таким образом, чтобы частота сокращений еще не отличалась от контрольной. Кривые концентрационной зависимости действия этих веществ определяли заранее (рис. 1). Далее в среду к этой группе (второй) амеб добавляли одно из веществ, протестированное в первой группе амеб, и снова определяли частоту сокращений вакуоли.

В работе были использованы следующие препараты фирмы Sigma-Aldrich (США) : АВП, АХ, хлорид холина, атропин, митолон, тубокурарин, а также специфические антагонисты рецепторов типов V_1 и V_2, 5-метилфурметид, эзерин, армин, карбохолин, динарфин А (1-13) и налаксон. Результаты экспериментов обрабатывали статистически с использованием однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA) и теста Newman-Keuls (программа GraphPad Prism 3).

Результаты и обсуждение

Как видно на рис. 2, АХ в концентрации 1 мкМ увеличивает частоту сокращений сократительной вакуоли *A. proteus*. При этом вещества, которые в отличие от АХ не расщепляются АХЭ, не меняют спонтанную частоту сокращений вакуоли амебы. В качестве таких веществ были использованы неселективный холиномиметик карбохолин, М2-холиномиметик 5-метилфурметид и хлорид холина, продукт энзиматического гидролиза АХ. Таким образом, на частоту сокращений вакуоли амебы влиял только препарат, расщепляющийся АХЭ, а именно АХ. Это дало нам основание предположить, что частота сокращений вакуоли амебы зависит от активности самой АХЭ. К выводу об участии АХЭ в регуляции водно-солевого обмена мы пришли и при исследовании мочевых пузырей лягушки *R. temporaria* (Багров, Манусова, 1978). АХ не влиял на стимулированный гидроосмотический поток ни у мочевых пузырей лягушки, ни у амебы (рис. 3).

Однако при сравнении влияния АХ у амфибий и простейших мы обнаружили и различия. АХ не влиял ни на спонтанный, ни на стимулированный поток воды по осмотическому градиенту у мочевых пузырей лягушки, а у амебы стимулировал частоту сокращений вакуоли дозо-

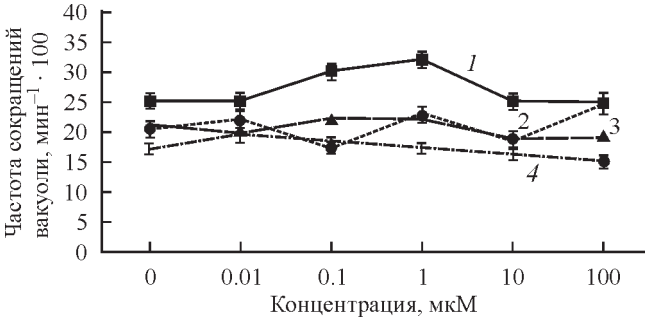

Рис. 2. Влияние АХ (*1*), карбохолина (*2*), 5-метилфурметида (*3*) и хлорида холина (*4*) на частоту спонтанных сокращения вакуоли *Amoeba proteus*.

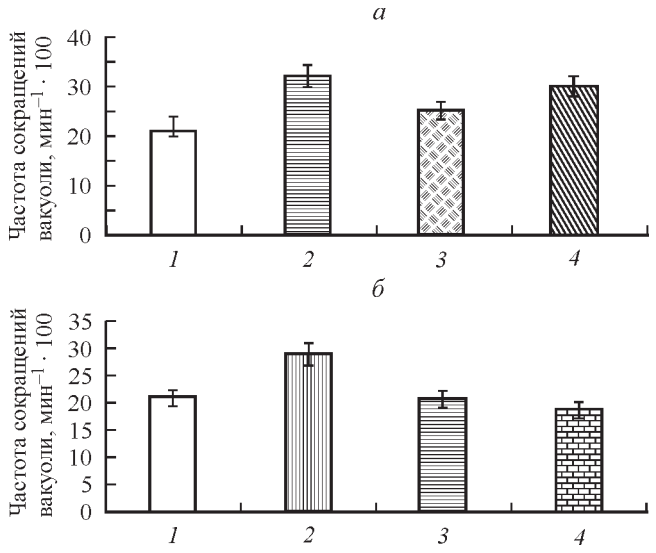

Рис. 3. Влияние антагонистов рецепторов АВП на способность АХ (*а*) и АВП (*б*) увеличивать частоту сокращений вакуоли *Amoeba proteus*.

1 — контроль; *2* — АХ (*а*) или АВП (*б*); *3*, *4* — АХ (*а*) или АВП (*б*) после предварительного 60-минутного действия 0.01 мкМ антагониста рецепторов АВП типа V_2 (*3*) или V_1 (*4*). Концентрация АХ и АВП 1 мкМ.

зависимым образом (рис. 2). Зависимость частоты сокращений вакуоли амебы от АХ несомненно свидетельствует об его участии в регуляции водно-солевого обмена *A. proteus.*

На рис. 3 видно, что на стимулированную АВП частоту сокращений вакуоли амебы сам АХ не влияет. В то же время гидроосмотический эффект АХ оказался чувствительным к ингибирующему влиянию блокатора рецепторов АВП типа V_1. Механизм этого влияния нам пока неясен.

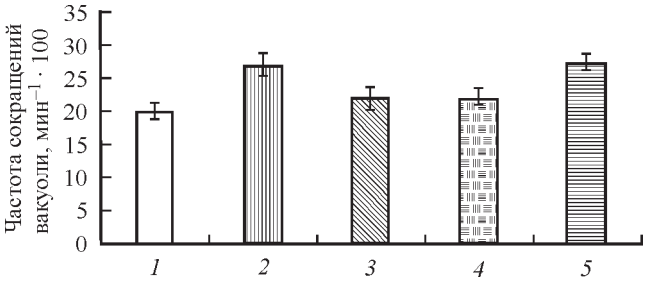

Рис. 4. Взаимодействие опиоидной и АХЭ-систем в регуляции частоты сокращений вакуоли *Amoeba proteus*.

1 — контроль; *2* — лиганд опиатных рецепторов динорфин А (1-13), 0.01 мкМ; *3* — АХ, 1 мкМ; *4* — динорфин, после предварительного 60-минутного действия АХ, 0.01 мкМ; *5* — динорфин после последовательного 30-минутного действия сначала 0.001 мкМ эзерина, затем 0.01 мкМ АХ.

Эффект АХ (1 мкМ) оказался нечувствительным к ингибиторам М-холинорецепторов атропину и митолону, но подавлялся блокатором N-холинорецепторов тубокурарина (см. таблицу). Это, несомненно, свидетельствует о том, что активация сократительной вакуоли АХ осуществляется через никотиновые холинорецепторы.

Из данных таблицы видно, что ингибиторы АХЭ армин и эзерин подавляли активирующее влияние АХ на скорость сокращений вакуоли, а не стимулирвали, как это обычно («классически») происходит при применении антихолинэстеразных препаратов у позвоночных. Таким образом, влияние ингибиторов АХЭ у амебы оказалось аналогичным влиянию этих препаратов на подавление АХ гидроосмотического эффекта АВП на изолированные мочевые пузыри лягушки *R. temporaria* (Багров, Манусова, 1978; Багров и др., 1991). В этих опытах на амебе ингибиторы АХЭ угнетали и самостоятельный эффект АХ. Ни АХ, ни ингибиторы АХЭ армин и эзерин не влияли на гидроосмотический эффект АВП у амебы см. (таблицу).

Изменение частоты сокращения вакуоли (ЧСВ) *Amoeba proteus*, вызванное АХ, АВП и динорфином А (1-13), на фоне предварительного действия холинергических веществ

Вещество, на фоне которого определяли ЧСВ, мкМ	ЧСВ (мин$^{-1}$ · 100) при активации		
	АХ, 1 мкМ	АВП, 1 мкМ	динорфин А (1-13), 0.01 мкМ
	28.80 ± 0.80	33.10 ± 1.45	30.80 ± 1.57
М-холиномиметики:			
атропин, 1	28.50 ± 0.85 (0.83)	28.40 ± 1.12 (0.37)	28.50 ± 1.77 (0.34)
митолон, 0.1	26.10 ± 1.33 (0.07)	26.70 ± 0.95 (0.06)	27.70 ± 1.55 (0.16)
5-метилфурметид, 0.1	19.30 ± 1.09 (0.006)	22.10 ± 1.39 (0.2)	27.90 ± 1.49 (0.19)
N-холиномиметик тубокурарин, 0.01	20.10 ± 0.58 (0.0001)	27.50 ± 0.92 (0.002)	25.50 ± 1.09 (0.009)
Ингибиторы АХЭ:			
эзерин, 0.001	24.50 ± 0.75 (0.0001)	29.40 ± 1.83 (0.13)	22.00 ± 1.47 (0.002)
армин, 0.01	24.20 ± 0.76 (0.0001)	29.80 ± 1.42 (0.11)	24.20 ± 1.29 (0.002)

Примечание. Время предварительного действия вещества 60 мин, активация — 30 мин. В скобках указана достоверность различия средних по сравнению с ЧСВ при действии АХ, АВП и динорфина А (1-13). Различия считали достоверными при $P \geq 0.05$.

Это может свидетельствовать о различных механизмах активации сократительной вакуоли амебы при действии АВП и АХ.

Ранее нами было показано, что у амебы *A. proteus* система АВП и опиоидная активируют сократительную вакуоль независимыми путями (Багров, Манусова, 2003). В связи с этим было интересно посмотреть, как взаимодействуют холинергическая и опиоидные системы у амебы. Стимулирующее действие активатора опиоидных к-рецепторов динорфина А (1-13) на сократительную вакуоль амебы снималось как активатором холинергических рецепторов АХ (рис. 4), так и блокаторами АХЭ армином и эзерином (см. таблицу). Из этого можно предположить, что эти системы взаимодействуют так же, как у позвоночных (Wessler, Kirkpatrick 2008; Соколова, Ашмарин, 1992).

Следовательно, можно было ожидать, что угнетение АХЭ усилит влияние АХ на эффект динорфина А (1-13). Оказалось, однако, все наоборот — «неклассически»: ингибирование АХЭ снимает угнетающее действие АХ на динорфин А (1-13) (рис. 4). И в этом случае мы имеем дело с «неспецифическим» влиянием АХЭ и на опиоидную систему. Внутриклеточные механизмы такого перекрестного взаимодействия этих систем будут предметом наших дальнейших исследований.

На основании полученных результатов мы можем предположить, что у амебы *A. proteus* регуляция водно-солевого равновесия осуществляется различными системами: антидиуретической (аргинин-вазопрессином), холинергической (АХ и АХЭ) и опиоидной (динорфином А (1-13)). Естественно, следует отдавать себе отчет в том, что применительно к одноклеточным понятие «система» отличается от аналогичного понятия у многоклеточных и тем более у позвоночных. Однако, как мы видим, эти «системы» у амебы обладают набором внутриклеточных специфических признаков, характерных и для более эволюционно развитых организмов. В частности, рецепторы этих систем блокируются одинаковыми специфическими антагонистами, а системы проведения сигнала, по крайней мере для АВП, характеризуются набором тех же элементов, что и у многоклеточных организмов. В системе передачи сигнала от рецепторов АВП участвуют аденилатциклаза, цАМФ и фосфодиэстераза. С другой стороны, цАМФ у простейших может выступать не только как вторичный, но и как первичный мессенджер. Необычная же функция АХЭ (синергиста, а не антагониста рецепторов АХ), которую мы наблюдали на мочевых пузырях лягушки, отчетливо видна и у одноклеточных, представителем которых является *A. proteus*.

Авторы приносят глубокую благодарность Ю. И. Подлипаевой (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург) за предоставленную для эксперимента культуру амеб.

Список литературы

Багров Я. Ю., Манусова Н. Б. 1978. Влияние ацетилхолина на вызванный питуитрином осмотический ток воды через стенку мочевого пузыря лягушки. Бюл. эксперим. биол. мед. 86 (9) : 321—327.

Багров Я. Ю., Манусова Н. Б. 2003. Об участии опиоидов и аргинин-вазопрессина в регуляции водно-солевого обмена у амебы *A.proteus.* Докл. РАН. 203 (2) : 269—272.

Багров Я. Ю., Манусова Н. Б. 2007. Гормональная регуляция сократительной вакуоли *A. proteus*: роль циклических нуклеотидов фосфодиэстераз. Докл. РАН. 414 : 177—179.

Багров Я. Ю., Манусова Н. Б., Никитина Е. Р. 2002. Действие аргинин-вазопрессина на *Amoeba proteus*: особенности передачи сигнала. Докл. РАН. 386 (4) : 559—561.

Багров Я. Ю., Манусова Н. Б., Острецова И. Б. 1991. Ацетилхолинэстераза и АДГ-зависимый транспорт воды в мочевом пузыре амфибий. Цитология. 33 (11) : 141—151.

Соколова Н. А., Ашмарин И. П. 1992. Опиоиды и сердце. Патол. физиол. эксперим. мед. 4 : 78—82.

Bagrov Ya. Yu., *Manusova N. B.*, *Nikitina E. R. 2003.* Effects of arginine-vasopressin and its functional analogs on contractile vacuole of *Amoeba proteus*: possible mechanisms of signal transduction. Protistology. 3 (1) : 4—8.

Couillard P., Pothier F., Mayers P. 1989. The effects of vasopressin and related peptides on osmoregulation in *Amoeba proteus*. Gen. Comp. Endocrinol. 76 : 106—113.

Corrado M. U., Politi H., Trielli F., Angelini C., Falugi C. 1999. Evidence for the presence of a mammalian-like cholinesterase in *Paramecium primaurelia* (Protista, Ciliophora) developmental cycle. J. Exp. Zool. Jan. 283 (1) : 102—105.

Falugi C., Amaroli A., Evangelisti V., Viarengo A., Corrado M. U. 2002. Cholinesterase activity and effects of its inhibition by neurotoxic drugs in *Dictyostelium discoideum*. Chemosphere. 48 (4) : 407—414.

Prescott D. M., Carrier R. F. 1964. Experimental procedures and cultural methods for *Euplotes eurystomus* and *Amoeba proteus*. In: Methods in cell physiology. New York; London: Acad. Press. 85—95.

Slotkin T. A., Ryde I. T., Wrench N., Card J. A., Seidler F. J. 2009. Nonenzymatic role of acetylcholinesterase in neuritic sprouting: regional changes in acetylcholinesterase and choline acetyltransferase after neonatal 6-hydroxydopamine lesions. Neurotoxicol. Teratol. 31 (3) : 183—186.

Webb C. P., *Greenfield S. A. 1992.* Non-cholinergic effects of acetylcholinesterase in the substantia nigra: a possible role for an ATP-sensitive potassium channel. Exp. Brain Res. 89 (1) : 49—58.

Wessler J., *Kirkpatrick C. J. 2008.* Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. Brit. J. Pharmacol. 154 : 1558—1561.

Поступила 16 XII 2010

EFFECT OF ACETYLCHOLINE AND ACETYLCHOLINESTERASE ON THE ACTIVITY OF CONTRACTILE VACUOLE OF *AMOEBA PROTEUS*

Ya. Yu. Bagrov, N. B. Manusova[1]

I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, St. Petersburg;
[1] e-mail: nmanus@rambler.ru

Acetylcholine (ACh, 1 μM) stimulates activity of the contractile vacuole of proteus. The effect of ACh is not mimicked by its analogs which are not hydrolyzed by acetylcholinesterase (AChE), i. e., carbacholine and 5-methylfurmethide. The effect of ACh is not sensitive to the blocking action of M-cholinolytics, atropine and mytolone, but is suppressed by N-cholinolytic, tubocurarine. The inhibitors of AChE, eserine (0.01 μM) and armine (0.1 μM), suppress the effect of ACh on amoeba contractile vacuole. ACh does not affect activation of contractile vacuole induced by arginine-vasopressin (1 μM), but it blocks such effect of opiate receptors agonist, dynorphin A1-13 (0.01 μM). This effect of ACh is also suppressed by the inhibitors of AChE. These results suggest that, in the above-described effects of ACh, AChE acts not as an antagonist, but rather as a synergist.

Key words: protozoa *Amoeba proteus*, contractile vacuole, acetylcholine, acetylcholinesterase, acetylcholinesterase non-enzymatic effect, arginin-vasopressin, dynorphin A (1-13).